



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

REC'D 12 AUG 2003

WIPO

PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200201540, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 2 de Julio de 2002.

Madrid, 22 de Julio de 2003

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

CARMEN LENCE REIJA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P20 020 1540

MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

TIPO DE SOLICITUD:

- ☐ ADICIÓN A LA PATENTE
☐ SOLICITUD DIVISIONAL
☐ CAMBIO DE MODALIDAD
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD
N° SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

02 JUL -2 11:42

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

- INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO

E NAVARRA, S.A. (67%)

- CHACQUES (33%)

JUAN CARLOS

ESPAÑOLA

ES

A31/179765

73

FRANCESA

FR

990875R00343

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

TELÉFONO 948 176 748

FAX 948 175 223

CORREO ELECTRÓNICO fpuente@unav.es

CÓDIGO POSTAL 31008

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

DOMICILIO Avda Pío XII, 53 2º

LOCALIDAD Pamplona

PROVINCIA Navarra

PAÍS RESIDENCIA España

NACIONALIDAD Española

7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

1.- Prosper Cardoso

2.- Herreros González

3.- Chacques

Felipe

Jesús

Juan Carlos

Española

Española

Francesa

PAÍS

ES

ES

FR

(8)

☒ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☐ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVEN. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MADRE-PROGENITORAS AUTOLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.L. NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENÉSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 21

☒ Nº DE REVINDICACIONES: 29

☐ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☐ OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200201540

FECHA DE PRESENTACIÓN

02 JUL -2 11:42

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE-PROGENITORAS AUTÓLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES.

El medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas comprende: entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y un medio de cultivo con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso, y es útil para cultivar y expandir células madre-progenitoras autólogas humanas. Composiciones conteniendo dichas células pueden ser implantadas en el paciente mediante un procedimiento de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional.

GRÁFICO



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21	NÚMERO DE SOLICITUD
22	FECHA DE PRESENTACIÓN
62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

71 SOLICITANTE (S)

INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A. (67%)

Juan Carlos CHACHQUES (33%)

DOMICILIO **Avda. Pío XII, 53 2ª, E-31008 PAMPLONA (ESPAÑA)** NACIONALIDAD **Española**

72 INVENTOR (ES) **Felipe PROSPER CARDOSO, Jesús HERREROS GONZALEZ y Juan Carlos CHACHQUES**

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION

**MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS MADRE-PROGENITORAS
AUTOLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES.**

57 RESUMEN

MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE-PROGENITORAS AUTÓLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES.

El medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas comprende: entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y un medio de cultivo con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso, y es útil para cultivar y expandir células madre-progenitoras autólogas humanas. Composiciones conteniendo dichas células pueden ser implantadas en el paciente mediante un procedimiento de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional.

MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE-PROGENITORAS AUTÓLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona, en general, con la obtención y manipulación de células madre-progenitoras autólogas humanas bajo condiciones que permiten su empleo en terapia celular. En particular, la invención se refiere a un medio de cultivo autólogo para el cultivo de dichas células y a su empleo en el cultivo y expansión de dichas células así como a composiciones que las contienen.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Uno de los mayores retos para la investigación biomédica radica en desarrollar estrategias terapéuticas que permitan reemplazar o reparar las células o tejidos dañados o destruidos en las enfermedades más devastadoras o discapacitantes: enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), diabetes, enfermedades musculares y cardíacas, insuficiencia hepática, etc.

15

Una de las estrategias terapéuticas más prometedoras es la Terapia Celular, fundamentada en el hecho comprobado de que es posible disponer de células, más o menos indiferenciadas, capaces de dividirse generando células diferenciadas funcionales, y, en algunos casos, incluso de regenerarse. Entre éstas se incluyen las células madre y las células progenitoras/precursoras, que, en su conjunto, serán denominadas células madre-progenitoras. Estas células pueden encontrarse en el embrión e incluso en tejidos adultos. La terapia celular consiste, por tanto, en el trasplante o implante en el paciente de una cantidad de células madre-progenitoras suficiente para reparar y restaurar la funcionalidad de un órgano dañado.

20

25

Una de las formas de terapia celular propuestas está basada en el empleo de células-madre progenitoras procedentes del adulto, obtenidas de un animal (células xenogénicas), de un donante (células alogénicas), u obtenidas del propio paciente (células autólogas). El uso de células madre-progenitoras autólogas estaría libre de algunos de los inconvenientes de las otras formas de terapia celular, tales como escasez de donantes, necesidad de tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo por el paciente, así como de los condicionantes éticos asociados con el uso de células embrionarias.

30

Sin embargo, para que la terapia celular se convierta en una realidad es necesario desarrollar un mayor conocimiento sobre cuáles son las células idóneas en cada caso y cómo identificarlas, y también desarrollar procedimientos para una adecuada manipulación de las células madre-progenitoras que las haga idóneas para su uso clínico.

5 La cardiomioplastia (CMP) celular autóloga es un ejemplo concreto de terapia celular para el tratamiento de enfermedades cardíacas (isquemia congestiva, insuficiencia cardíaca, etc.). Una descripción general actualizada puede encontrarse en *Curr. Control. Trials Cardiovasc Med.* 2001; 2:208-210 (D.A. Taylor). Procedimientos y composiciones para el aislamiento, cultivo, expansión y empleo de diferentes células madre-progenitoras
10 útiles en CMP celular pueden encontrarse en US5130141, WO/0107568, WO/0194555, WO79854301, US2001/0038837 y US5543318.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15 La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar células madre-progenitoras autólogas humanas, adecuadas para su empleo en terapia celular, y, en particular, con el problema de proporcionar un procedimiento para una adecuada manipulación de las células madre-progenitoras que las haga idóneas para su uso clínico, incluyendo procedimientos específicos para su obtención, cultivo, purificación y expansión.

20 La solución proporcionada por esta invención se basa en el hecho de que los inventores han observado que el empleo de un medio de cultivo autólogo, que comprende suero autólogo humano y nutrientes, junto con un anticoagulante y un agente para revertir la anticoagulación, permite el cultivo *in vitro*, la purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas, las cuales pueden ser utilizadas en la elaboración de
25 composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas patologías mediante terapia celular.

La invención se ilustra mediante la obtención de un medio de cultivo autólogo, que comprende nutrientes, suero autólogo humano, heparina y protamina, y su empleo en el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras musculares
30 autólogas humanas útiles para la elaboración de composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de cardiomiopatías tanto isquémicas como idiopáticas mediante CMP celular autóloga.

Un aspecto de esta invención se relaciona con un medio de cultivo de células

madre-progenitoras autólogas humanas que comprende suero humano autólogo y nutrientes, junto con un anticoagulante y un agente para revertir la anticoagulación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la preparación de dicho medio de cultivo de células madre-progenitoras autólogas humanas. En una
5 realización particular, el suero humano autólogo presente en dicho medio de cultivo ha sido obtenido por plasmaféresis.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho medio de cultivo para el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras autólogas humanas en dicho medio de cultivo y purificar las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de una
15 composición de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, útiles para su empleo en terapia celular, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en dicho medio de cultivo y purificar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición enriquecida en
20 células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método terapéutico de CMP
25 celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

1. Medio de cultivo autólogo

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas, en adelante “medio de cultivo autólogo de la invención”, que comprende:

- a) entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo;
- b) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina;
- c) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y
- d) un medio de cultivo con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso.

El medio de cultivo autólogo de la invención es un medio de cultivo completo elaborado a partir de suero humano autólogo obtenido del propio paciente objeto del posterior implante de las células madre-progenitoras autólogas humanas. El suero humano autólogo, si se desea, puede ser sometido a un tratamiento convencional, por ejemplo, tratamiento térmico, con el fin de inactivar el complemento.

El suero autólogo humano puede ser obtenido del propio paciente objeto del posterior implante de las células madre-progenitoras autólogas humanas mediante cualquier método convencional, por ejemplo, a partir de muestras sanguíneas del paciente o bien, preferentemente, mediante la realización de una plasmaféresis a dicho paciente. En una realización particular de esta invención, la plasmaféresis se realiza utilizando heparina como anticoagulante y sulfato de protamina para revertir la anticoagulación. Como es conocido, las plasmaféresis se realizan utilizando, habitualmente, ACD (solución Anticoagulante-Citrato-Dextrosa) [por ejemplo, para 1 litro de agua se añade ácido cítrico monohidrato (8 g), citrato (22 g) y glucosa monohidrato (24,5 g)] como anticoagulante. Este anticoagulante aporta quelante del calcio por lo que para revertir el efecto del ACD y obtener suero a partir de la plasmaféresis es necesario añadir calcio lo cual interfiere posteriormente en el cultivo celular. La realización de una plasmaféresis permite obtener un suministro de suero significativamente elevado, superior al obtenido a partir de muestras sanguíneas del paciente, puesto que en la plasmaféresis no hay pérdida de sangre del paciente, lo que supone un beneficio importante para el paciente. Además, la utilización del suero obtenido mediante plasmaféresis con heparina y protamina posibilita su utilización en el medio de cultivo sin problemas posteriores en el cultivo celular.

El medio de cultivo autólogo de la invención contiene los nutrientes básicos y, opcionalmente, glutamina. Existen medios comercialmente disponibles que aportan los nutrientes necesarios para el cultivo celular. En principio, cualquier medio que proporcione los nutrientes adecuados para el cultivo celular puede ser utilizado en la presente invención. En una realización particular, los nutrientes son aportados por el medio HAM F12 [GIBCO BRL].

En una realización particular, el medio de cultivo autólogo de la invención contiene, además, un antibiótico. Prácticamente cualquier antibiótico podría ser utilizado en la presente invención. En una realización particular, el medio de cultivo autólogo de la invención comprende un antibiótico seleccionado entre penicilina, estreptomicina, gentamicina y sus mezclas. Asimismo, el medio de cultivo autólogo de la invención también puede contener, si se desea, un agente antifúngico, por ejemplo, anfotericina B, y/o un factor de crecimiento, por ejemplo, un factor de crecimiento de fibroblastos tal como el factor de crecimiento fibroblástico básico humano (bFGF) nativo o recombinante.

En una realización particular, el medio de cultivo autólogo de la invención comprende:

89% en peso de medio HAM-F12;
10% de suero humano autólogo del paciente;
heparina 0,1-10.000 UI/mL;
protamina 0,1 a 10.000 UI/mL; y
1% de penicilina/estreptomicina y, opcionalmente,
0,25 mg/ml de anfotericina B y/o
0,1 a 250 pg/ml de bFGF recombinante.

2. Método para la preparación del medio de cultivo autólogo de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la preparación del medio de cultivo de células madre-progenitoras autólogas humanas proporcionado por esta invención, que comprende mezclar y homogeneizar los distintos componentes del mismo.

Ventajosamente, dicho suero humano autólogo se obtiene por plasmaféresis, tal como se ha mencionado previamente, utilizando heparina como anticoagulante para obtener plasma y protamina para revertir la anticoagulación y obtener el suero. De esta manera, el suero humano autólogo obtenido ya contiene la heparina y protamina.

3. Empleo del medio de cultivo autólogo de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del medio de cultivo autólogo de la invención para el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas.

5 El empleo de suero autólogo humano en un medio de cultivo para la expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas presenta numerosas ventajas, por ejemplo, la expansión celular puede realizarse en cualquier parte del mundo, sin el riesgo de contaminación con priones, virus o zoonosis inherente a las técnicas tradicionales de cultivo celular que utilizan suero bovino fetal para el crecimiento celular. El empleo de
10 suero autólogo humano en cultivos de células humanas en lugar de suero bovino presenta numerosas ventajas ya que (i) evita la reacción antígeno-anticuerpo, (ii) evita las reacciones inflamatorias causadas por proteínas heterólogas; y (iii) evita la destrucción celular como consecuencia de los repetidos lavados que necesitan las células cultivadas en suero bovino antes de su administración a los seres humanos. De hecho, la experiencia
15 clínica actual, con CMP celular autóloga ha demostrado la presencia de arritmias ventriculares malignas en pacientes 2 semanas después de la terapia con células cultivadas en suero bovino complicación que, en el 40% de los casos, ha requerido el implante de desfibriladores.

20 4. Método para la preparación de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la preparación de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas, que comprende incubar
25 dichas células madre-progenitoras autólogas humanas en el medio de cultivo autólogo de la invención y purificar las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas.

Prácticamente cualquier célula madre-progenitora autóloga humana puede ser cultivada y expandida en el medio de cultivo autólogo de la invención, adaptando en cada caso las condiciones del medio y del cultivo al tipo celular concreto. No obstante, en una
30 realización particular, que se describirá con detalle en el siguiente apartado, dichas células madre-progenitoras autólogas humanas son células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

Las células madre-progenitoras autólogas humanas pueden obtenerse mediante la realización de una biopsia en el propio paciente objeto del posterior implante de tales células madre-progenitoras autólogas humanas.

La incubación de las células madre-progenitoras autólogas humanas en el medio de cultivo autólogo de la invención se realiza mediante condiciones que permiten el crecimiento y división celular.

La purificación de las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas puede realizarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la purificación de dichas células madre-progenitoras autólogas humanas consiste en una inmunopurificación y se realiza mediante el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas, que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras autólogas humanas. Ventajosamente, dichos anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas están unidos a microesferas magnéticas para purificar y enriquecer las células madre-progenitoras autólogas humanas mediante un clasificador celular magnético.

Las células madre-progenitoras autólogas humanas, obtenidas según el procedimiento previamente descrito, pueden presentarse en forma de composiciones farmacéuticas, y pueden ser utilizadas en terapia génica.

5. Método para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas

Como se ha mencionado previamente, en una realización particular y preferida de esta invención, las células madre-progenitoras autólogas humanas son células madre-progenitoras musculares (o células miogénicas) autólogas humanas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, adecuadas para su empleo en terapia celular, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en dicho medio de cultivo y purificar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas.

Las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas pueden obtenerse mediante la realización de una biopsia en el propio paciente objeto del posterior implante

de tales células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, en particular, una biopsia de músculo esquelético.

Estudios previos pusieron de manifiesto que la administración al paciente, anterior a la realización de la biopsia, en la zona de la biopsia, de una composición farmacéutica que comprende un agente farmacológico que estimula la proliferación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas permite incrementar el número de dichas células al inicio del cultivo. En una realización particular, este preacondicionamiento se realiza mediante la administración al paciente, antes de realizar la biopsia de músculo esquelético, generalmente en un periodo de tiempo comprendido entre 2 días y 15 minutos antes de realizar dicha biopsia, por vía intramuscular, en la zona donde se va a realizar tal biopsia, de una composición farmacéutica que comprende dicho agente farmacológico que estimula la proliferación celular. En una realización particular, dicho agente farmacológico es un anestésico local, tal como lidocaína o bupivacaína, que estimula la proliferación de los mioblastos, lo que se traduce posteriormente en un mayor rendimiento del cultivo celular.

Mediante la biopsia de músculo esquelético se recoge una muestra de tejido muscular que se somete a un tratamiento convencional para digerir las fibras musculares tal como se describe posteriormente con más detalle. La suspensión celular resultante se cultiva en el medio de cultivo autólogo de la invención. En general, la muestra extraída mediante la biopsia muscular contiene distintos tipos de tejidos, tales como adipocitos, fibroblastos, progenitores mesenquimales, células hematopoyéticas, fibras musculares, tejido vascular (endotelio, músculo liso) y, obviamente, mioblastos y células satélite. Típicamente, el contenido inicial en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas presentes en la muestra de tejido esquelético extraída mediante la biopsia, definidas como CD56+/CD45- es inferior al 10%. Asimismo, existe también un pequeño porcentaje de células madre (células satélite) de muy difícil identificación que son las que se reproducen y diferencian hacia células musculares que expresan el antígeno CD56 y que serían progenitores musculares. Como es conocido, el proceso de diferenciación de este tipo celular comprende el paso de célula satélite a mioblasto, luego a miocito inmaduro, a continuación a miocito maduro y, finalmente a miofibra. Los progenitores musculares serían los mioblastos y los miocitos (maduros e inmaduros), que pueden ser identificados por la presencia del antígeno CD56, la expresión intracitoplasmática de desmina y la ausencia del antígeno CD45 (es decir, presentan un fenotipo CD56+/desmina+/CD54-).

Durante el cultivo celular se produce una proliferación de células satélite y mioblastos que se diferencian hasta, como mucho, miocitos. Por tanto, tras la incubación y expansión celular, en el medio de cultivo se acumulan mioblastos y miocitos (maduros e inmaduros) que son utilizados en la elaboración de una composición farmacéutica para inyectar células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en el paciente y que, una vez inyectados, terminan su proceso de diferenciación en el propio paciente transformándose en fibras musculares o miofibras y desarrollando su función.

La incubación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en el medio de cultivo autólogo de la invención se realiza mediante condiciones que permiten la expansión (crecimiento y división) celular.

La purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas puede realizarse por cualquier método convencional. En una realización particular, la purificación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, por ejemplo, anticuerpos anti-CD56 humano (CD56 es un antígeno extracelular característico de células de músculo esquelético) en ausencia del antígeno específico de células hematopoyéticas CD45 (es decir, se seleccionan las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-). Ventajosamente, dichos anticuerpos están unidos a microesferas magnéticas para purificar y enriquecer las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante un clasificador celular magnético. En otra realización particular, el cultivo celular se somete a un paso previo de pre-siembra (pre-plating) con el fin de sedimentar los fibroblastos antes de proceder a identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas. En este caso, la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende someter al cultivo celular a un paso de pre-siembra con el fin de sedimentar la totalidad o parte de los fibroblastos presentes en dicho cultivo celular y, posteriormente, identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

La composición que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenible según el método descrito previamente constituye un aspecto adicional de esta invención.

Alternativamente, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, a partir de una biopsia de tejido de músculo esquelético, para la preparación de una composición farmacéutica, que comprende:

- a) la realización de una biopsia en un paciente objeto del posterior implante de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para extraer un fragmento de tejido de músculo esquelético que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas;
- b) el cultivo de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas procedentes del músculo esquelético en el medio de cultivo autólogo de la invención, bajo condiciones que permiten la expansión de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas;
- c) la purificación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas; y
- d) la recolección de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas; y, opcionalmente,
- e) la congelación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas hasta la preparación de dicha composición farmacéutica.

Como se ha mencionado previamente, la administración local al paciente, en un periodo de tiempo comprendido entre 2 días y 15 minutos antes de realizar la biopsia muscular, en la zona de la biopsia, de lidocaína o bupivacaína estimula la proliferación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas y permite aumentar el número de dichas células al inicio del cultivo.

El cultivo de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas procedentes del músculo esquelético en el medio de cultivo autólogo de la invención, bajo condiciones que permiten la expansión de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas, incluye la realización de una serie de tratamientos previos convencionales, por ejemplo, lavado, eliminación del tejido adiposo, desmenuzamiento del músculo, disociación enzimática, filtración y recogida de las células mediante, por ejemplo, mediante sedimentación. En general, tras la digestión enzimática de las fibras musculares se obtiene una suspensión celular que contiene gran cantidad de detritus celulares. Tras los pases de cultivo se eliminan los restos de células y fibras y se enriquece en células madre-progenitoras musculares.

La purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas persigue, entre otros, el objetivo de obtener composiciones enriquecidas en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas sustancialmente exentas de fibroblastos. Para ello, el cultivo celular puede ser sometido a un primer paso de pre-siembra (pre-plating), mediante la que sedimentan los fibroblastos de forma más rápida que los mioblastos o células satélites, y a un proceso posterior de identificación y separación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas mediante cualquier método convencional, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, tal como anticuerpos anti-CD56 humano en ausencia de expresión de CD45. Ventajosamente, dichos anticuerpos están unidos a unas microesferas magnéticas.

Finalmente, las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas se recolectan y, si se desea, en caso de que no vayan a ser utilizadas inmediatamente, se congelan hasta la preparación de dicha composición farmacéutica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición enriquecida en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas que comprende una cantidad significativamente elevada de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas y un medio de cultivo autólogo de la invención. Como es conocido, la concentración de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en la composición es muy importante ya que si la concentración de dichas células es inferior a un determinado valor, la eficacia de dicha composición disminuye ostensiblemente. Aunque se han descrito en modelos animales composiciones con concentraciones elevadas

de células madre-progenitoras, las concentraciones obtenidas con células madre-progenitoras musculares autólogas humanas son, en general, del 50% aproximadamente. Sin embargo, una de las características de la presente invención radica en la posibilidad de obtener composiciones de células madre-progenitoras autólogas humanas con una
5 concentración en dichas células igual o superior al 70%, preferentemente, igual o superior al 80%, más preferentemente, igual o superior al 90%, debido a la posibilidad de enriquecer la composición mediante la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, por ejemplo, mediante la inmunopurificación de células CD56+/CD45-. El método de obtención de dicha composición que comprende células
10 madre-progenitoras musculares autólogas humanas, que comprende un tratamiento previo de purificación, permite garantizar que la concentración de células madre-progenitoras musculares en la composición es siempre igual o superior al 70%.

De esta manera, la invención satisface, además, una necesidad demandada por los procedimientos de CMP celular autóloga consistente en obtener niveles muy altos de
15 células madre-progenitoras musculares autólogas humanas (mioblastos y miocitos) evitando la presencia de otros tipos celulares indeseables, por ejemplo, fibroblastos. Dicha composición enriquecida de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas puede ser obtenida, tal como se ha mencionado previamente, mediante un primer paso de pre-siembra y un proceso posterior de identificación y separación de dichas células, que
20 presentan un fenotipo CD56+/CD45-, mediante anticuerpos que específicamente reconocen dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, opcionalmente unidos a microesferas magnéticas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, junto con, al
25 menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica es adecuada para su administración por vía parenteral. En principio, cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable capaz de vehiculizar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas puede ser utilizado en la presente invención. En una realización particular, dicha composición farmacéutica
30 comprende albúmina que se utiliza como excipiente para resuspender las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición de células madre-progenitoras musculares autólogas

preparada para su uso terapéutico en un implante celular, que comprende, al menos, 20 millones de células por ml, con una densidad celular de, al menos, 50 millones de células/ml y, al menos, 40% de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de la invención, y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende entre 20 y 200 millones de células por ml, con una densidad celular comprendida entre 50 y 70 millones de células/ml y, una pureza de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de la invención, y, albúmina humana en una cantidad comprendida entre 0,1% y 20% en peso respecto al total.

Las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, obtenidas según el procedimiento previamente descrito, así como las composiciones farmacéuticas que las contienen, pueden utilizarse en la elaboración de una composición farmacéutica:

para la reparación y/o reconstitución de tejido muscular cardíaco, y/o

para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca post-isquémica, y/o

para el tratamiento de la miocardiopatía dilatada y/o

para el tratamiento de cardiomiopatía no isquémica.

6. Procedimiento terapéutico

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento terapéutico de CMP celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, debido a su capacidad de regenerar tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; comprendiendo dicho procedimiento recoger una muestra de material procedente del cuerpo del paciente objeto del implante posterior que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, expandir dichas células mediante cultivo en un medio de cultivo autólogo proporcionado por esta invención e implantar las células madre-progenitoras autólogas humanas recolectadas en el paciente al que previamente se le había extraído dicho material conteniendo las células madre-progenitoras musculares autólogas.

De forma más concreta, la invención proporciona un procedimiento terapéutico de CMP celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-

progenitoras musculares autólogas humanas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; y donde dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- 5 a) la toma al paciente de una biopsia de músculo esquelético tomada de un músculo, preferentemente, preacondicionado mediante una inyección intramuscular de un anestésico local, tal como lidocaína o bupivacaína;
- 10 b) la preparación de un medio de cultivo de las células madre-progenitoras autólogas humanas a partir de suero autólogo del paciente;
- c) la preparación de una composición enriquecida de células madre-progenitoras musculares autólogas a partir de la biopsia de a) y del medio de cultivo de b);
- 15 d) la preparación de una composición farmacéutica a partir de la composición de c); y
- e) el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas de d) en lesiones miocárdicas.

20

Las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprenden mioblastos y miocitos (maduros e inmaduros) y tienen la capacidad de regenerar tejido cardíaco cuando se implantan en el músculo cardíaco.

25 Tal como se utiliza en la presente descripción el término "lesiones miocárdicas" hace referencia tanto a cardiomiopatías isquémicas como idiopáticas. En una aplicación particular, el procedimiento de CMP celular autóloga según la presente invención se aplica a pacientes con una cardiomiopatía isquémica debida a un infarto de miocardio sin posibilidad de revascularización quirúrgica o percutánea, así como a pacientes subsidiarios de revascularización cardíaca. El objetivo de esta CMP celular autóloga sería limitar la

30 expansión del infarto, el remodelado cardíaco y la regeneración del miocardio. La definición de cardiomiopatía isquémica incluye a los pacientes con infarto del ventrículo derecho o del ventrículo izquierdo, en este último caso con posibilidad de regurgitación isquémica de la válvula mitral. En otra aplicación particular, el procedimiento de CMP

celular autóloga según la presente invención se aplica a pacientes con una cardiomiopatía idiopática dilatada.

Entre los beneficios de la CMP celular se pueden citar la disminución de fibrosis, la reducción del área de la cicatriz del infarto y la mejora de la elasticidad y propiedades de la pared ventricular (esenciales para restablecer la función diastólica).

En una realización particular, el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas de d) en lesiones miocárdicas se realiza mediante inyección directa. El término "implante mediante inyección directa" tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a una administración epicárdica o endovascular de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención en pacientes con cardiomiopatías isquémicas o idiopáticas. En una realización particular, se realiza una administración epicárdica o endovascular de la composición farmacéutica de la invención en pacientes con cardiomiopatía isquémica distribuida de la siguiente forma: un 70% aproximadamente en el área periférica al infarto y un 30% aproximadamente en la parte central de la cicatriz. La administración epicárdica puede realizarse bien por exposición quirúrgica convencional o bien por toracoscopia. En la aproximación quirúrgica (toraco/esternotomía clásica o mini) el área isquémica queda bien expuesta permitiendo realizar las inyecciones de la composición terapéutica en la zona infartada y, mayoritariamente, en la zona que la circunda. La inyección de la composición farmacéutica conteniendo células madre-progenitoras musculares autólogas humanas proporcionada por esta invención también puede realizarse en la zona perilesional. Con esta distribución del implante propugnada en la presente invención se consigue una mayor supervivencia de las células implantadas en la región periférica por la irrigación residual y la revascularización miocárdica colateral existente y se evita en parte la elevada mortalidad celular que se observa en los implantes que se realizan en la cicatriz isquémica altamente fibrótica.

En otra realización particular, el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas de d) en lesiones miocárdicas se realiza mediante administración sistémica o intracoronaria a través de un acceso venoso percutáneo.

En otra realización particular, el procedimiento de CMP celular autóloga según la presente invención se aplica a pacientes con una cardiomiopatía idiopática dilatada realizándose múltiples implantes de la composición farmacéutica proporcionada por la invención entre las arterias coronarias en el miocardio de los dos ventrículos.

En la actualidad se dispone de nuevos sistemas quirúrgicos computerizados para su uso en cirugía cardíaca. La realización de puentes o by-pass coronarios asistidos robóticamente mediante acceso torácico se está incrementando ya que permite una recuperación del paciente rápida y segura con un reducido riesgo de infecciones y un excelente resultado cosmético. En una realización particular, el implante se realiza mediante inyección directa transepicárdica utilizando el mencionado sistema robotizado computerizado. En una realización concreta la aguja se inserta en el miocardio mediante un brazo de robot controlado mediante vídeo, la jeringa se localiza fuera del tórax y se conecta con la aguja mediante un tubo extensor de pequeño diámetro. La ventaja de esta aproximación en pacientes con insuficiencia cardíaca es que el procedimiento terapéutico de CMP celular autóloga puede realizarse de forma segura sin manipulaciones del corazón, evitando el riesgo de alteración hemodinámica y fibrilación ventricular.

El efecto beneficioso de la CMP celular podría estar limitado por la tasa de mortalidad de las células inyectadas. Para resolver este problema, la invención propone realizar inyecciones periódicas mediante procedimientos de implante percutáneo o quirúrgicos de las células madre-progenitoras autólogas de la presente invención. Esta aproximación permitiría lograr el objetivo de la CMP, reduciendo progresivamente las áreas infartadas o mejorando el miocardio patológico. Con este fin la invención incluye la creación de un banco personalizado de cada paciente de células madre-progenitoras autólogas, originado a partir de células aisladas y congeladas durante el procedimiento de cultivo celular de cada individuo. A partir de las células madre-progenitoras autólogas almacenadas pueden expandirse nuevos cultivos celulares para la preparación de nuevas composiciones evitando nuevas biopsias o eliminación de tejidos.

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

En este ejemplo se describe la obtención y manipulación de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para su empleo en un procedimiento de CMP celular autóloga con el fin de revertir el tejido miocárdico disfuncional dañado en una estructura histológica viva capaz de generar presión sistólica y diastólica.

1.1 Biopsia de músculo esquelético

Un día antes de proceder a realizar la biopsia quirúrgica se inyectó al paciente, por vía intramuscular, una solución al 2% de lidocaína, en y alrededor del músculo del vasto lateral. La biopsia se realiza mediante una incisión de 5 cm en el vasto lateral, y, en condiciones estériles, se extrae un fragmento de 2 a 3 cm³ de músculo esquelético (unos 15 g). Inmediatamente después se fragmenta el tejido muscular extraído con unas tijeras, se introduce en medio de cultivo completo o en una solución de tampón fosfato (PBS) y se mantiene a 4°C. El procedimiento para el aislamiento y purificación celular y su cultivo se debe comenzar lo antes posibles para garantizar la supervivencia celular. Las muestras se transportan al laboratorio de Biología Celular en un contenedor apropiado y a baja temperatura.

1.2 Preparación del medio de cultivo autólogo

A partir de muestras de sangre

En un Centro de Transfusión de Sangre, se recoge sangre venosa del paciente. Mediante venipuntura se rellenan 50 tubos de 10 ml para recogida de suero. Después de la sedimentación celular y precipitación de la fibrina, bajo cabina de flujo laminar se extrae el suero de cada tubo y se recoge en una bolsa de sangre vacía. Se toman muestras de suero para ensayos hematológicos y microbiológicos (bacterias y virus). La bolsa con el suero se congela a -80°C a la espera de recibir los resultados de los ensayos hematológicos y microbiológicos.

Antes de preparar el medio de cultivo se inactiva el complemento del suero a 56°C durante 1 hora y se filtra. Parte del suero se combina con el medio de cultivo y se mantiene a 4°C, se calienta hasta 37°C y se filtra antes de añadir al frasco con el cultivo celular. El medio de cultivo final contiene un 10% de suero humano autólogo del paciente, 89% de medio HAM-F12 (GIBCO BRL, Cat. No. 21765), 1% de penicilina/estreptomicina, heparina (2 UI/ml de suero obtenido), protamina (en forma de sulfato) (3 UI por ml de suero obtenido) y, opcionalmente, anfotericina B (0,25 mg/ml) y/o de 0,1 a 250 pg/ml de bFGF recombinante.

El suero humano restante se congela a -40°C a la espera de una nueva preparación de medio de cultivo. En cada preparación de medio se inactiva nuevamente el complemento a 56°C durante 1 hora con filtrado posterior.

A partir de plasmaféresis

Inmediatamente antes de iniciar el procedimiento de plasmaféresis se administra al paciente una dosis de 50 UI/kg de heparina sódica no fraccionada. El proceso de plasmaféresis se realiza según el procedimiento de rutina previsto para el equipo empleado.

- 5 Durante la plasmaféresis el anticoagulante estándar es sustituido por una solución fisiológica de cloruro sódico 0,9% con heparina como anticoagulante. El plasma se sustituye por albúmina al 5%. El procedimiento se termina una vez obtenido el volumen de plasma necesario para la preparación del medio de cultivo autólogo. Se calcula la cantidad de heparina en el plasma obtenido en función del volumen plasmático del paciente y se
- 10 añade 1,5 UI de protamina por cada UI de heparina. Se mantiene así hasta que se produce la coagulación del plasma. Entonces se extrae el suero y se distribuye en pequeñas alícuotas que se congelan. Al igual que para el suero obtenido de muestras sanguíneas, también en este caso las muestras de suero se analizaron hematológica y microbiológicamente antes de ser utilizadas.

15

1.3 Aislamiento de las células satélite y expansión *in vitro*

Todas las manipulaciones se realizan en condiciones asépticas y utilizando una cabina de flujo laminar. Los fragmentos de músculo esquelético explantado se lavan con PBS. Con unas tijeras se elimina el tejido adiposo y con cuidado se desmenuza el músculo.

- 20 Los fragmentos de músculo se lavan nuevamente con PBS hasta que el sobrenadante aparezca limpio. Se centrifuga durante 5 minutos a 100g. El tejido se disocia mediante 2 tratamientos enzimáticos consecutivos: primero las células se incuban con colagenasa IA (1,5 mg/ml/g de tejido) y se dejan incubando durante 1 hora. Cada 10 minutos se agitan los tubos para favorecer mecánicamente la disociación. Alternativamente, los tubos pueden
- 25 colocarse en un incubador con agitación recíprocante/orbital (ROSI) a 37°C. En segundo lugar se incuba durante 20 minutos con un 0,25% de tripsina 1 x EDTA (2 ml). A continuación se lavan las células (10 minutos a 300g) y para detener la reacción enzimática se añade 1 ml del propio suero del paciente obtenido previamente. Se realiza una filtración a través de una malla 40 µm (cell stainer nylon). Con los fragmentos que hayan podido
- 30 quedar en la malla se repite nuevamente el procedimiento de digestión. Finalmente las células del filtrado se recogen por sedimentación (20 minutos a 300g) y el sobrenadante se desecha.

Las células se resuspenden en medio de cultivo completo fresco: 10% de suero humano autólogo del paciente, 89% de medio HAM-F12 (GIBCO BRL, Cat. No. 21765), 1% de penicilina/estreptomicina y, opcionalmente, anfotericina B (0,25 mg/ml), que contiene, además, heparina (2 UI/ml de suero obtenido) y protamina (en forma de sulfato) (3 UI por ml de suero obtenido), y se siembran en frascos para cultivo celular. A continuación, los frascos se incuban durante 3 semanas a 37°C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO₂. Los frascos se colocan en el incubador sin gradiente de nivel para evitar una proliferación celular irregular. Después de un periodo de incubación de 2 a 3 días se renueva en el medio para eliminar las células sanguíneas y las células muertas. Cuando se llega a la sub-confluencia (50% de confluencia) se realiza un paso de los cultivos (fracción 1:5) para evitar la aparición de diferenciación miogénica a mayores densidades. A confluencias del 50% se requerirán múltiples pasos del cultivo para prevenir que las células mononucleadas se diferencien en miotubos multinucleados.

En cada paso de los cultivos, las células se cosechan por tripsinización (2 ml de 0,25% tripsina-EDTA en cada frasco durante 1 a 5 minutos en el incubador). El desprendimiento completo de las células se comprueba observando al microscopio las células que flotan. Entonces se detiene la reacción mediante adición de medio de cultivo completo y la suspensión de células resultante se reparte en otros 5 frascos. En cada paso del proceso de cultivo celular se realizan controles para bacterias (ensayos de aerobios y anaerobios), virus y hongos.

1.4 Eliminación de fibroblastos

Normalmente los fibroblastos contaminan los cultivos por lo que es necesario eliminarlos para obtener una expansión de mioblastos adecuada. En el momento de realizar el primer pase, y, después de neutralizar con tripsina, las células cultivadas se mantienen en el incubador durante 30 minutos. Este periodo de tiempo es suficiente para que los fibroblastos sedimenten mientras que la mayoría de los mioblastos (más pequeños) permanecen en suspensión. Se recoge el sobrenadante celular y se transfiere a nuevos frascos de cultivo. La pureza de las células mioblásticas se valora por citometría de flujo con un anticuerpo anti-CD56 humano y tinción de desmina intracelular. Las muestras con una pureza de mioblastos inferior al 50% se someten a un procedimiento de enriquecimiento celular. Para ello, en el momento del segundo pase, después de cosechar las células y antes de resembrarlas, éstas se marcan con un anticuerpo de ratón anti-CD56

humano al que se han unido unas microesferas magnéticas. Mediante una selección positiva realizada con un clasificador celular magnético se tienen poblaciones celulares altamente enriquecidas de mioblastos progenitores de células musculares que expresan CD56 y desmina en más del 90% de las células.

- 5 Habitualmente, para obtener la cantidad final de células necesaria se deben realizar varios pases. En general, al cabo de unas 3 semanas, se obtienen más de 200 millones de células. Este número puede escalararse mediante pases en un sistema de cultivo multicadena.

1.5 Aislamiento de células para el banco personalizado

- 10 Para cada paciente, durante el proceso de cultivo celular pueden aislarse algunas células que serían congeladas. A partir de esas células almacenadas pueden expandirse nuevos cultivos celulares, para realizar inyecciones intramiocárdicas repetidas periódicas (evitando así el tener que repetir nuevas biopsias). En el momento del segundo pase, algunas muestras de células positivas para CD56 altamente enriquecidas se criopreservan
15 utilizando 5% de DMSO, se someten a una congelación programada y finalmente se almacenan en nitrógeno líquido. La concentración celular será de 25 a 50 millones de células por ml. Cuando sea necesario, las células se descongelan y se cultivan en medio de mioblastos para su posterior utilización (implante percutáneo) una vez se haya realizado la expansión *ex vivo*.

20

1.6 Medio de inyección

- El día del trasplante celular, se cosechan las células y se lavan en medio de inyección (albúmina humana 0,5% y medio de cultivo completo) y se mantienen en hielo antes del implante. Por citometría de flujo se valora la tasa final de pureza de los
25 mioblastos. Mediante un citómetro de Malassez (mediante tinción con tripán blue) se determina la concentración celular y su viabilidad. Asimismo, antes del implante, se valora la esterilidad del cultivo celular (test de Gram).

1.7 Procedimiento de implante celular

- 30 El implante celular puede realizarse mediante una administración epicárdica o endovascular. La administración epicárdica puede realizarse bien por exposición quirúrgica convencional o bien por toracoscopia. En la aproximación quirúrgica (toraco/esternotomía clásica o mini) el área isquémica queda bien expuesta permitiendo realizar alrededor de 10

inyecciones de suspensión celular en la zona infartada y mayoritariamente en la zona que la circunda. Para este propósito se utiliza una aguja curvada de 23 a 26 G x 4 cm. La densidad celular recomendada está comprendida entre 50 y 70 millones de células/ml. La inyección se realiza lentamente, durante aproximadamente 15 minutos. Después de cada inyección los orificios de la aguja deberán bloquearse mediante presión dactilar (1 a 2 minutos) para evitar que haya una regurgitación de la suspensión celular.

Protocolo de implante de los mioblastos:

- implante de, al menos, 20 millones de células por ml, preferentemente, unos 200 millones de células por ml
- densidad celular: 50 a 70 millones de células por ml
- tiempo de cultivo: aproximadamente 21 días
- concentración de mioblastos: superior a 70%
- vida media celular a 2-8°C: 96 horas.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas que comprende:

- 5 a) entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo;
 b) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de heparina;
 c) entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y
 d) un medio de cultivo con nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso.

10

2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que dicho suero autólogo humano ha sido sometido a un tratamiento con el fin de inactivar el complemento.

15 3. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que dicho suero autólogo humano ha sido obtenido a partir de muestras sanguíneas del paciente.

 4. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que dicho suero autólogo humano ha sido obtenido mediante la realización de una plasmaféresis al paciente donante de dicho suero.

20

 5. Medio de cultivo según la reivindicación 4, en el que dicha plasmaféresis se realiza utilizando heparina como anticoagulante y sulfato de protamina para revertir la anticoagulación.

25 6. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, además, un antibiótico.

 7. Medio de cultivo según la reivindicación 6, en el que dicho antibiótico se selecciona entre penicilina, estreptomicina, gentamicina y sus mezclas.

30

 8. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, además, anfotericina B y/o un factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF).

9. Medio de cultivo según la reivindicación 1, que comprende:

89% de medio HAM-F12;

10% de suero humano autólogo del paciente;

heparina 0,1 a 100 UI/ml;

protamina 0,1 a 100 UI/ml; y

1% de penicilina/estreptomicina y, opcionalmente,

0,25 mg/ml de anfotericina B y/o

0,1 a 250 pg/ml de bFGF recombinante.

9. Un método para la preparación de un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la mezcla de suero humano autólogo, heparina, protamina, nutrientes básicos con o sin glutamina, junto con, opcionalmente, antibióticos, y/o anfotericina B y/o un factor de crecimiento de fibroblastos.

10. Método según la reivindicación 9, en el que dicho suero autólogo humano ha sido obtenido por plasmaféresis.

11. Empleo de un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el cultivo *in vitro*, purificación y expansión de células madre-progenitoras autólogas humanas.

12. Un método para la preparación de una composición de células madre-progenitoras autólogas humanas, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras autólogas humanas en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y purificar las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas.

13. Método según la reivindicación 12, en el que la purificación de las células madre-progenitoras autólogas humanas obtenidas se realiza mediante el empleo de anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas, que permiten la identificación de antígenos extracelulares característicos de dichas células madre-progenitoras autólogas humanas.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dichos anticuerpos específicos y selectivos para dichas células madre-progenitoras autólogas humanas están unidos a microesferas magnéticas.

5

15. Un método para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, útiles para su empleo en terapia celular, que comprende incubar dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y purificar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas obtenidas.

10

16. Método según la reivindicación 15, en el que la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

15

17. Método según la reivindicación 15, en el que la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende someter al cultivo celular a un paso de pre-siembra con el fin de sedimentar la totalidad o parte de los fibroblastos presentes en dicho cultivo celular y, posteriormente, identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

20

25

18. Un procedimiento para la obtención de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, a partir de una biopsia de tejido muscular, para la preparación de una composición farmacéutica, que comprende:

- 30 a) la realización de una biopsia en un paciente objeto del posterior implante de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas para extraer un fragmento de tejido de músculo esquelético que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas;

- 5 b) el cultivo de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas procedentes del músculo esquelético en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, bajo condiciones que permiten la expansión de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas;
- 10 c) la purificación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas cultivadas; y
- d) la recolección de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas; y, opcionalmente,
- 15 e) la congelación de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas purificadas hasta la preparación de dicha composición farmacéutica.

20 19. Procedimiento según la reivindicación 18, que comprende la administración local al paciente, en la zona de la biopsia, antes de realizarla, de una composición farmacéutica que comprende un agente farmacológico que estimula la proliferación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

25 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que dicho agente farmacológico comprende un anestésico local, seleccionado entre lidocaína y bupivacaína.

30 21. Método según la reivindicación 18, en el que la purificación de las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas comprende someter al cultivo celular a un paso de pre-siembra para sedimentar la totalidad o parte de los fibroblastos presentes en dicho cultivo celular y, posteriormente, identificar y separar las células madre-progenitoras musculares autólogas humanas mediante el empleo de anticuerpos anti-CD56 humano, opcionalmente, unidos a microesferas magnéticas, y la selección de las células que manifiestan un fenotipo CD56+/CD45-.

22. Composición enriquecida en células madre-progenitoras musculares autólogas humanas que comprende, al menos, un 70% de dichas células madre-progenitoras musculares autólogas humanas.

5

23. Composición farmacéutica que comprende, al menos, 20 millones de células por ml, con una densidad celular de, al menos, 50 millones de células/ml y, al menos, 40% de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

24. Composición farmacéutica según la reivindicación 23, que comprende entre 20 y 200 millones de células por ml, con una densidad celular comprendida entre 50 y 70 millones de células/ml y, una pureza de células madre-progenitoras autólogas CD56+/CD45-, medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y, albúmina humana en una cantidad comprendida entre 0,1% y 20% en peso respecto al total.

15

25. Un procedimiento terapéutico de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; comprendiendo dicho procedimiento recoger una muestra de material procedente del cuerpo del paciente objeto del implante posterior que comprende células madre-progenitoras musculares autólogas humanas, expandir dichas células mediante cultivo en un medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, e implantar las células madre-progenitoras autólogas humanas recolectadas en el paciente al que previamente se le había extraído dicho material conteniendo las células madre-progenitoras musculares autólogas.

25

30

26. Un procedimiento terapéutico de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido miocárdico disfuncional mediante el implante de una composición farmacéutica que comprende células madre-progenitoras musculares

autólogas humanas, regeneradoras de tejido cardíaco, expandidas y mantenidas *ex vivo* en un medio de cultivo autólogo; y donde dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

- 5 a) la toma al paciente de una biopsia de músculo esquelético tomada de un músculo, preferentemente, preacondicionado mediante una inyección intramuscular de un anestésico local;
- 10 b) la preparación de un medio de cultivo de las células madre-progenitoras autólogas humanas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, a partir de suero autólogo del paciente;
- 15 c) la preparación de una composición enriquecida de células madre-progenitoras musculares autólogas humanas a partir de la biopsia de a) y del medio de cultivo de b);
- 20 d) la preparación de una composición farmacéutica a partir de la composición de c); y
- e) el implante de la composición farmacéutica de células madre-progenitoras autólogas humanas de d) en lesiones miocárdicas.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el implante de dicha composición de células madre-progenitoras autólogas humanas se realiza mediante inyección directa en la región periférica a la cicatriz del infarto o por inyección en los espacios intercoronarios de ambos ventrículos.

28. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el implante de dicha composición de células madre-progenitoras autólogas humanas se realiza mediante administración sistémica o intracoronaria mediante acceso venoso percutáneo.

29. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el implante de dicha composición de células madre-progenitoras autólogas humanas se realiza mediante un sistema robotizado y computerizado.

RESUMEN**MEDIO DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE-PROGENITORAS AUTÓLOGAS HUMANAS Y SUS APLICACIONES**

El medio de cultivo autólogo de células madre-progenitoras autólogas humanas
5 comprende: entre 0,1% y 90% en peso de suero humano autólogo; entre 0,1 y 10.000
UI/ml de heparina; entre 0,1 y 10.000 UI/ml de protamina; y un medio de cultivo con
nutrientes básicos con o sin glutamina, en cantidad suficiente hasta el 100% en peso, y es
útil para cultivar y expandir células madre-progenitoras autólogas humanas.
Composiciones conteniendo dichas células pueden ser implantadas en el paciente mediante
10 un procedimiento de cardiomioplastia celular autóloga para crear, regenerar y reparar tejido
miocárdico disfuncional.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.